

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS DO CAFÉ CRU PRODUZIDO EM SANTA RITA DO SAPUCAÍ-MG**

PAULO GUIMARÃES TAVARES

Florianópolis-SC

Julho/2011

PAULO GUIMARÃES TAVARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS DO CAFÉ CRU PRODUZIDO EM SANTA RITA DO SAPUCAÍ-MG**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Agronomia da
Universidade Federal de Santa Catarina como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof. Dra. Roseane Fett

Florianópolis-SC

Julho/2011

PAULO GUIMARÃES TAVARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS DO CAFÉ CRU PRODUZIDO EM SANTA RITA DO SAPUCAÍ-MG**

Este Trabalho de Graduação foi julgado adequado para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo e aprovado em sua forma final pela Comissão examinadora e pelo Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho (CCA-UFSC)

Coordenadora de Estágios do Curso de Agronomia

Banca Examinadora

Prof. Dra. Roseane Fett (CCA-UFSC)

Prof. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa (CCA-UFSC)

Prof. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho (CCA-UFSC)

Florianópolis-SC

Julho/2011

Agradecimentos

Eu agradeço ao meu pai. Pelo destino passamos dez anos separados. Foi muito bom ter você de volta e receber seu conselho: “Vai pra minas sô!”. Agradeço à minha mãe, além de me carregar por nove meses no ventre, tolerou meu retorno ao lar em pleno TCC. Agradeço ao meu irmão, por razões que não caberiam nessas paginas, um abraço para você.

Agradeço toda minha família paulista e mineira. Apesar da infância em terras distantes e estudo em terras do sul, o coração voltou para onde veio. Um abraço especial para meus tios Vespasiano, Marcinho e Geraldo pela ajuda nas empreitadas e viagens.

Um grande agradecimento aos funcionários da CooperRita, e muito obrigado ao Vincentão, Mauro, Claudio e às duas senhoras que serviam o café-com-leite e pão-com-manteiga de tarde. Agradeço também a todos aqueles com quem convivi em Santa Rita do Sapucaí, especialmente o seu João Luiz por me hospedar em sua casa; a Magda, minha fada madrinha que iluminou toda minha aventura; e o Julio Costa, sim Julio, tanto a vivência quanto o estágio foram muito importantes para minha vida, um brinde a vocês.

Acima de tudo, agradeço a Roseane por me aceitar como orientando e me oferecer a oportunidade de realizar meu trabalho no laboratório de química de alimentos. Sem ela esse trabalho não seria possível. Agradeço também todos os enjalecados do laboratório, apesar do meu silêncio, aprecio muito o apoio de vocês.

Por fim agradeço todos aqueles que compõem minha família escolhida, graças a vocês eu não implodi nesses últimos cinco anos. Obrigado Ketherine, Vitor e Thiago, pelas conversas, abraços, presença constante, desabafos, sonhos e amizade. Now I have somebody to love!

“No começo, todo café é de bebida mole,

Em essência todo café é perfeito.”

- Mauro de Melo, Engenheiro Agrônomo da EMATER-MG.

Resumo

O Brasil é reconhecido como maior produtor mundial de café, e o estado com maior produção é Minas Gerais. De acordo com normas brasileiras, o grão de café é classificado de acordo com a quantificação de defeitos e análise sensorial, ambas efetuadas por amostragem. Existem mais de 800 substâncias dentro do grão de café com destaque para a cafeína e ácido clorogênico, que são de grande interesse como compostos bioativos. O conteúdo desses compostos está associado à classificação do grão de café e torna-se importante no cenário do agronegócio brasileiro. Procurou-se quantificar o teor de cafeína e ácido clorogênico, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante, teor de umidade e compostos voláteis, e resíduo mineral fixo em grãos de café cru classificados como sendo de bebida mole, dura, riada e rio. O teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e a atividade antioxidante pelos métodos de poder de sequestro de radicais DPPH e poder redutor FRAP não apresentaram variação significativa entre as amostras de grãos de café cru de diferentes bebidas. O teor de cafeína quantificado pela técnica de CE permaneceu similar entre as amostras de grãos de café cru de diferentes bebidas, não havendo diferença significativa. O teor de ácido clorogênico quantificado pela técnica de CE variou significativamente entre as amostras de grãos de café cru de diferentes bebidas. O teor de ácido clorogênico foi menor em grãos de café cru de bebida de melhor qualidade. O teor de umidade e compostos voláteis, e teor de resíduo mineral fixo apresentaram uma pequena variação estatística entre as amostras de café cru de diferentes bebidas, porém essa variação não teve correlação com a classificação da bebida do grão.

Palavras chave: café, cafeína, ácido clorogênico, eletroforese capilar.

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração botânica de <i>Coffea arabica</i> L.....	18
Figura 2: Molécula de ácido clorogênico.....	22
Figura 3: Molécula de cafeína.....	24
Figura 4: Diagrama esquemático da eletroforese capilar.....	27
Figura 5: Eletroferograma da amostra dos padrões de cafeína, ácido difenil acético e CGA.....	44
Figura 6: Eletroferograma da amostra de bebida mole com seus picos e respectivos espectros.....	46
Figura 7: Eletroferograma da amostra de bebida dura com seus picos e respectivos espectros.....	46
Figura 8: Eletroferograma da amostra de bebida riada com seus picos e respectivos espectros.....	47
Figura 9: Eletroferograma da amostra de bebida rio com seus picos e respectivos espectros.....	47

Lista de tabelas

Tabela 1: Teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu em extratos de grãos de café cru.....	40
Tabela 2: Sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picridrazil (DPPH) em extratos de grãos de café cru.....	41
Tabela 3: Potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) em extratos de grãos de café cru.....	41
Tabela 4: Parâmetros das curvas analíticas para os padrões de cafeína e ácido clorogênico.....	44
Tabela 5: Limites de detecção e determinação obtidos pela relação sinal/ruído.....	45
Tabela 6: Teor de cafeína, em extratos de grãos de café cru utilizado a técnica da eletroforese capilar.....	48
Tabela 7: Teor de ácido clorogênico, em extratos de grãos de café cru utilizado a técnica da eletroforese capilar.....	48
Tabela 8: Teor de umidade e substâncias voláteis em amostras de grãos de café cru moídos.....	50
Tabela 9: Teor de resíduo mineral fixo em amostras de grãos de café cru moídos.....	51

Lista de abreviaturas e símbolos

σ desvio padrão

AAE equivalente de ácido ascórbico

ACN acetonitrila

CE eletroforese capilar

CGA ácido clorogênico

CQA ácido cafeolquínico

CooperRita cooperativa regional agropecuária de santa Rita do sapucaí

CV coeficiente de variação

DAA ácido difenil acético

DAD diode array detector

diCQA ácido dicafeolquínico

DPPH 2,2-difenil-1-picrildrazil

Ep Erro padrão

FeCl₃ cloreto férrico

FRAP potencial antioxidante de redução do ferro

GAE equivalente de ácido gálico

HCl hidrocloreto

HPLC cromatografia líquida de alta precisão

LOD limite de detecção

LOQ limite de quantificação

mF massa fresca

n repetições

PI padrão interno

R^2 coeficiente de determinação

r regressão

SDS dodecil sulfato de sódio

TE equivalente de trolox

TBS tetraborato de sódio

TPTZ 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

UV/VIS ultravioleta/visível

Sumário

2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. HISTÓRIA DO CAFÉ E ASPECTOS GERAIS.....	15
2.2. BOTÂNICA DO CAFEIEIRO.....	17
2.3. CLASSIFICAÇÃO DO CAFÉ	19
2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ	20
2.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
2.6. ELETROFORESE CAPILAR.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS.....	29
4.2. EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	30
4.3. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	31
4.4. PREPARO DOS EXTRATOS	32
4.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	33
4.6. DETERMINAÇÃO DO PODER DE SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES PELO MÉTODO 2,2-DIFENIL-1-PICRILDRAZIL (DPPH).....	34
4.7. DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR PELO MÉTODO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP).....	35
4.8. ELETROFORESE CAPILAR	36
4.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E COMPOSTOS VOLÁTEIS	37
4.10. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO MINERAL FIXO.....	38
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, PODER DE SEQUESTRAR RADICAIS LIVRES E PODER REDUTOR.....	40
5.2. ELETROFORESE CAPILAR	43
5.2.1 Escolha do padrão interno	43

5.2.2. Avaliação do desempenho do método.....	44
5.2.3. Quantificação das amostras	45
5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E COMPOSTOS VOLÁTEIS	50
5.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO MINERAL FIXO	51
6. CONCLUSÕES.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. Introdução

O Brasil tem a reputação histórica de ser o maior país cafeicultor do mundo. O Brasil possui um cafezal com uma área total produtiva de 2,1 milhões de hectares. Essa área cafeeira possibilita ao país uma produção de 47 milhões de sacas, sendo a exportação de 17,1 milhões de sacas e o consumo interno de 19,3 milhões de sacas (ABIC, 2010; MAPA, 2010).

A agroindústria mundial de café perde apenas para o petróleo em termos de movimentação de dólares (NAIDU et al., 2008).

O parque cafeeiro em produção no Brasil concentra-se na região centro-sul do país, com destaque para o estado de Minas Gerais, maior produtor nacional em peso, detentor da melhor qualidade e o primeiro café brasileiro a apresentar um certificado de indicação geográfica. Minas Gerais, conta com três grandes regiões cafeeiras: Sul, Zona da Mata e Cerrado (BLYENY, 2004; PINO; VEGRO, 2008).

Sabe-se que fatores bióticos e abióticos influenciam a composição físico-química do grão de café, dando origem a variadas características organolépticas que caracterizam um café em relação a uma região produtora e permitem a análise da qualidade do café (FRANCA et al., 2005; DUARTE et al., 2010).

Trabalhos tentam correlacionar a qualidade final da bebida do café com a composição química do grão cru (PINTO et al., 2001).

O cafeeiro passou a ser considerado uma planta funcional nutracêutica, devido à presença dos compostos fenólicos que, além de serem relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café, são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante. Entre os principais componentes da fração fenólica figuram os ácidos clorogênicos (CGA), na forma de diversos isômeros, considerados os mais importantes e os que se

apresentam em maior quantidade nos grãos de café cru (FARAH; DONANGELO, 2006; SOUZA et al., 2007).

Naidu et al., (2008) observaram um alto poder de redução e sequestro de radicais livres em extratos aquosos de grãos de café cru indicando que o grão pode ser usado como matéria prima para a produção de nutracêuticos.

Neste estudo, objetivou-se quantificar alguns dos compostos bioativos e analisar a atividade antioxidante *in vitro* de grãos de café cru.

2. Revisão da literatura

2.1. História do café e aspectos gerais

O nome em português “café” vem do idioma árabe qahwah, este nome passou para o turco kaveh que deu origem a palavras semelhantes em outros idiomas. Citando aqui a tradução da palavra “café” nos idiomas de maior relevância para sua história; qahwah (árabe), kahwah (egípcio), kaffa (etíope), café (francês), koffie (holandês), kahveh (turco) (PINO; VEGRO, 2008).

Em manuscrito do lêmén datado de 575 está registrado a Lenda de Kaldi, lenda que narra a descoberta do café por volta do século III d.C. Kaldi era um pastor de cabras Etíope. Um dia ele percebeu que seu rebanho estava dançando alegremente. Kaldi observou que, ao mastigarem certo arbusto, seu rebanho apresentava-se mais disposto, resistente e veloz no caminhar. Kaldi ao experimentar as frutas vermelhas desse arbusto constatou o efeito estimulante que esses proporcionavam. O evento transcorrido por Kaldi e seu rebanho de cabras se espalhou pela região, e as frutas e folhas passaram a ser consumidas pelo seu efeito estimulante (PINO; VEGRO, 2008; MARTINS, 2009).

O cafeeiro é originado do estado da Etiópia no continente Africano. O berço do cafeeiro é desde a província Kaffa ao planalto do Lago Tana, onde nasce o Nilo Azul, portanto, regiões oeste a noroeste da Etiópia. O café foi levado via comércio e invasões para a região do lêmén na Arábia no ano 525, onde se adaptou bem ao clima e economia do país. A Arábia foi durante anos o maior produtor e exportador do café, tendo monopólio das pequenas frutas vermelhas que saíam do país pelo porto de Moka na cidade do lêmén. Em 1615, o grão de café entrou na Europa pelos portos de Veneza na Itália, passando a compor o mercado de especiarias e artigos de luxo. Esse grão “comercial” era vendido sem o endocarpo (pergaminho), que impossibilitava sua germinação.

Devido ao seu grande poder marítimo e mercantil, foram os Holandeses que primeiro trouxeram mudas de cafeeiro à Europa em 1616, provenientes da região do lêmén. Essas mudas foram cultivadas nas estufas de Amsterdã e posteriormente levadas às colônias Indianas de Java em 1658, e Ceilão (hoje Sri Lanka) em 1699, onde os Holandeses deram início ao seu cultivo.

Em 1699 o embaixador Turco, Suleiman Aga em sua visita à Paris, presenteia Luis XIV com grãos de café. Maravilhados com essa bebida exótica, a corte Francesa desperta para consumo do café. Os Holandeses, em 1713, fornecem mudas de cafeeiro como presente aos Franceses que logo dão início ao cultivo em estufas e em 1715 ao cultivo de cafezais na ilha de Bourbon (hoje Reunião) no leste da África.

Gabriel Mathieu de Clieu, cavalheiro Francês foi o bravo introdutor da *Rubiaceae* na América central. Em 1719 obteve mudas de café do Jardin des Plantes em Paris, e às transportou à ilha de Martinica ao norte da Guiana Francesa. Em homenagem ao seu heroísmo, existe hoje uma estatua de Gabriel Mathieu de Clieu no Jardim Botânico da Martinica.

Em 1727 o bandeirante Francisco de Melo Palheta, sargento mor com patente da marinha, oficial da capitania do Maranhão, nascido no Pará filho de portugueses, parte em missão do governo para uma expedição à Guiana Francesa com a tarefa de fazer respeitar a divisa entre este país e o Brasil. Havia também o intuito de, sigilosamente, obter mudas de café para o governo Brasileiro. No ano 1727, Francisco de Melo Palheta com o grande auxílio de Madame D'Orvillier, esposa do governador de Caiena, traz ao Brasil 4 pés de café e muitas sementes (PINO; VEGRO, 2008; MARTINS, 2009).

O café se espalha pelo Brasil a partir de sua porta de entrada no Pará, chegando ao Maranhão ainda na década de 20, Ceará na década de 40, Rio de Janeiro na década de 60, Alagoas, Goiás e Bahia na década de 70, São Paulo e Minas Gerais na década de 90 (MARTINS, 2009).

2.2. Botânica do cafeeiro

O cafeeiro pertence à família botânica *Rubiaceae* com centro de origem na Etiópia, do continente Africano. Existem mais de 500 gêneros e mais de 8.000 espécies na família das *Rubiaceae* (PINO; VEGRO, 2008).

O gênero *Coffea* engloba cerca de 100 espécies (DAVIS et al., 2006), sendo *C. arabica* (o arábica) e *C. canephora* (o conilon ou robusta) as duas espécies de importância comercial para o Brasil. O café arábica é geralmente cultivado em regiões com altitude entre 400 e 1000 m. Possui aromas intensos e vários sabores com variações de corpo e acidez, podendo apresentar diversas tonalidades de cor verde. É considerado o café de melhor qualidade, mais fino e requintado (BLYENY, 2004).

As duas variedades de café arábica mais cultivadas são mundo novo e catuaí. Uma das principais características do mundo novo é a alta produtividade de seus cafeeiros. Apesar dessa vantagem, o grande porte do mundo novo dificulta sua colheita. Dentro desta variedade Catuaí, que significa "muito bom", existem duas linhagens: o Catuaí Vermelho e o Catuaí Amarelo (COFFEEBREAK, 2006).

A produção de café arábica responde por cerca de 75% da produção cafeeira do Brasil, enquanto que a produção de robusta representa 25% (ABIC, 2010; MAPA, 2010).



Figura 1: Ilustração botânica de *Coffea arabica* L.

Fonte: Site: <http://expressocafe.webnode.com.br/> Livro: Cultivares de Café: autor Carlos H. S. de Carvalho, Embrapa Café, 2008.

O cafeeiro é um arbusto perene que, devido à alternância de seu ciclo vegetativo e reprodutivo, é podado para revigorar a planta e melhorar a produção (THOMAZIELLO et al., 2000). A raiz possui com um eixo central de 50-60 cm de profundidade e raio de 50-60 cm de forma cônica. As folhas são de forma elíptica à lanceolada, com 12-25 cm de comprimento e 5-12 cm de largura. Possui constituição coriácea, cor verde escura na face adaxial e esbranquiçada na face abaxial e disposição oposta no ramo. Flores brancas, amareladas ou róseas são localizadas em inflorescências do tipo glomérulo, também chamadas de roseta, nas axilas das folhas. A flor é composta por cinco pétalas soldadas na base formando a corola e cinco sépalas compondo o cálice. O sistema reprodutivo masculino consiste em cinco estames soldados às pétalas que se abrem longitudinalmente. O sistema reprodutivo feminino consiste em um ovário bilocular contendo dois óvulos e um estilete com dois estigmas. O fruto ao amadurecer possui a casca de cor vermelha, amarela ou roxa. Cada pequena baga possui duas sementes sendo cada uma envolta pelo endocarpo (pergaminho) e mucilagem. Ambas são circundadas pelo mesmo mesocarpo (polpa) e pericarpo (casca) (CARDOSO, 1994; THOMAZIELLO et al., 2000; CORREA, 1984).

2.3. Classificação do café

A classificação oficial do café Brasileiro é realizada de acordo com a quantificação dos defeitos presentes no grão cru e com uma análise sensorial da bebida. Outros critérios tais como a região, ano da safra, forma de beneficiamento, espécie, tamanho, forma, cor, torra e moagem também são usados para avaliar a qualidade do café (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005; FRANCA et al., 2005; FARAH et al., 2006).

A quantificação de defeitos é feita pela contagem de grãos defeituosos, impurezas e matéria estranha dentro de amostras de 300 g de grãos de café cru. Grãos defeituosos incluem grãos pretos, verdes, ardidos, brocados, chochos e conchas. Impurezas são detritos provenientes do próprio cafeeiro e incluem pau, casca, grão marinheiro e grão coco. Matéria estranha são detritos não oriundos do cafeeiro e incluem pedras, torrões de terra, e sementes e folhas de outras espécies vegetais (MAPA, 2003). Cada um dos itens acima citados possui um valor equivalente de defeito de acordo com seu grau de equivalência a um número específico de grão(s) preto(s). A soma desses valores de equivalência permite classificar o café em número de defeitos por amostra de 300 g de grãos crus. Essa classificação determina o que é conhecido como o tipo do café, sendo atribuído à amostra um valor de 2 (bom) à 8 (ruim) de acordo com a baixa ou alta quantidade de defeitos respectivamente (FRANCA, MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005; FRANCA et al., 2005).

A análise sensorial da bebida é realizada pelo teste de xícara, que consiste em uma infusão contendo água, e grão torrado e moído de café. Para cada amostra de café cerca de 120 g de grãos de café cru são submetidos à torra leve e moagem grossa. Cerca de 8 g à 10 g de grão torrado e moído é distribuído em 10 xícaras de vidro previamente higienizadas. Esse pó é escaldado com água mineral ou água filtrada à aproximadamente 90°C, logo após sua primeira fervura. As infusões devem ser mexidas para homogeneizar

a mistura e para a liberação do vapor que contem o aroma. Após a decantação do pó de café e resfriamento da infusão, que fica a critério do degustador, é realizada a degustação da bebida de café com auxílio de uma colher de prova que deve ser lavada em água mineral ou filtrada entre a prova da cada xícara. O aroma, sabor e grupo da bebida devem ser anotados no laudo de classificação. A bebida de café é classificada em estritamente mole, mole, apenas mole, dura, riada, rio e rio zona de acordo como a análise sensorial (FARAH et al., 2006; FRANCA et al., 2005; MAPA, 2003).

2.4. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café

A composição de bioativos do café, uma das bebidas mais populares do mundo, tem despertado interesse como uma potencial fonte de compostos bioativos benéficos, sobretudo os polifenóis e a cafeína.

Os compostos fenólicos são metabólicos secundários de plantas envolvidos na adaptação a condição de estresse ambiental. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas características desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e quelatação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, em razão da ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias. Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis sobre espécies reativas de oxigênio, eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, apresentarem ação pró-oxidante, gerando espécies reativas de oxigênio ou inibindo o processo de antioxição (FARAH; DONANGELO, 2006; SOUZA et al., 2007).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais como antioxidantes. Estão divididos em dois principais grupos, com base em sua estrutura e na maneira pela qual os anéis polifenólicos ligam-se uns aos outros, eles são classificados em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ou ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos têm sido relacionados à sua capacidade antioxidante *in vitro* como sequestrador de radicais livres, formados no início do processo de oxidação, bem como da sua atuação como quelantes de metais (ANGELO; JORGE, 2007), modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como seu potencial como agente antibactericida, antialérgico e antiinflamatório (MANACH et al., 2004).

O termo ácido clorogênico (CGA) refere-se aos principais compostos fenólicos do grão de café, engloba uma família de compostos de ésteres, formados principalmente pelo ácido quínico com os ácidos caféico, ferúlico ou cumárico. Os grãos de café cru contêm os seguintes grupos: três monoésteres de ácido caféico (ácidos cafeoilquínicos, ACQ); três monoésteres do ácido p-cumárico (ácidos cumaroilquínicos, ACQ); três monoésteres do ácido ferúlico (ácidos feruloilquínicos, AFQ); três diésteres de ácido caféico (ácidos decafeoilquínicos, diACQ), e seis diésteres de ácido caféico e ferúlico (ácidos dicafeoilferuloilquínicos, ACFQ) (MARIA; MOREIRA, 2004).

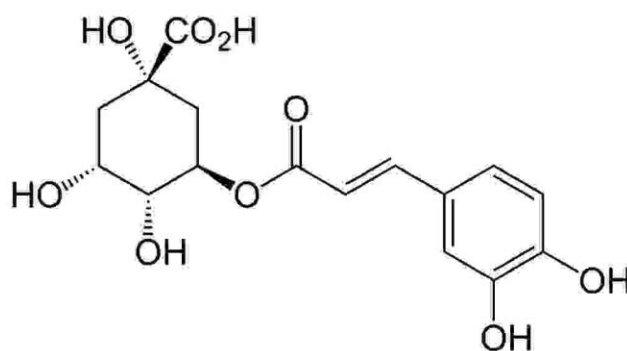


Figura 2: Molécula de ácido clorogênico.

Fonte: Site: <http://livefitblog.com/2010/07/16/chlorogenic-acid-in-coffee-antioxidant/>

O grão cru de café é conhecido como o principal alimento fonte dos ácidos clorogênicos, com teor igual ou excedido apenas pelas folhas verdes do *Ilex paraguayensis* (CLIFFORD, 1999; NAIDU et al., 2008).

A presença de CGA é de grande importância fisiológica para a planta do cafeeiro (Farah; Donangelo, 2006). Esse mesmo composto químico e seus isômeros também contribuem para a formação de aromas, sabores e cores na bebida do café. A composição de fenólicos em grãos crus e qualidade global da bebida são determinadas por fatores como variedade genética, manejo durante o cultivo, condições ambientais, processamento e torra.

Farah e Donangelo (2006) encontraram quantidades de 4,0% a 8,4% de ácido clorogênico em matéria seca de grão de café cru, e perdas de até 95% durante uma torra bem escura.

Durante os processos de beneficiamento e torra esses ácidos clorogênicos podem ser isomerizados, hidrolisados e degradados, pela reação de esterificação entre um ácido quínico e um ácido cinâmico (FARAH; DONANGELO, 2006; NAIDU et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2010).

O ácido clorogênico é importante na formação das características organolépticas da bebida do café, devido ao aroma forte e intenso, e ao sabor químico, ácido e adstringente (FARAH et al., 2006; TRUGO et al., 1984). A contribuição do ácido clorogênico ainda é controversa uma vez que os

diferentes isômeros presentes em diferentes teores afetam a qualidade da xícara de modo específico. Assim não é possível atribuir um único perfil organoléptico a todo o grupo dos ácidos clorogênicos (FARAH et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2010).

De acordo com Duarte et al., (2010) o modo de beneficiamento pela via úmida produz um grão com teores mais elevados de ácido clorogênico e trigonelina, com uma pequena perda no teor de sacarose, quando comparada à via semi-seca. O teor de sacarose encontrado no grão cru beneficiado pela via úmida foi de aproximadamente 8,0 g/100g a 10,8 g/100g de matéria seca, e de aproximadamente 7,10 g/100g a 14,5 g/100g de matéria seca no grão preparado pela via semi-seca.

Os ácidos orgânicos são compostos que apresentam o grupo carboxila em sua estrutura molecular. Segundo Galli e Barbas, (2004) esses ácidos estão presentes no café, compondo até cerca de 11% da massa do grão cru e 6% da massa do grão torrado.

Os ácidos orgânicos encontrados no grão cru são o acético, cítrico, fórmico, málico, pirúvico, clorogênico, quínico e succínico. Uma vez que a maioria dos ácidos orgânicos presentes no grão de café são voláteis, contribuem para a formação de aromas e sabores na bebida do café. O conjunto de aromas e sabores relacionados com os ácidos orgânicos é de reconhecida importância na qualidade sensorial da bebida, fator este que o consumidor busca na escolha do café (GALLI; BARBAS, 2004; RODRIGUES et al., 2007).

Os flavonóides são uma família de compostos que pertencem ao grupo dos polifenóis. São caracterizados por uma estrutura molecular com múltiplos anéis benzênicos. Exercem função antioxidante no corpo humano tendo, portanto importância fisiológica e farmacêutica. Flavonóides têm função de pigmentação e originam sabores e aromas no café (LOTITO; FREI, 2006; FERNANDEZ et al., 2010).

Pesquisas recentes observaram que o teor de compostos bioativos variam dependendo da variedade de café e é afetado pelas condições de processamento (HECIMOVIC et al., (2011).

. Estudos têm demonstrado elevado poder antioxidante dos compostos flavonóides quando analisados *in vitro* (LOTITO; FREI, 2006). O mesmo resultado não foi observado na análise *ex vivo* do plasma que mostrou uma baixa concentração de flavonóides. Esse fator não exclui a possibilidade dos flavonóides se acumularem em tecidos específicos ou de atuarem de modo não-antioxidante em outros processos metabólicos.

A cafeína é um alcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas, sendo então um derivado da xantina. A xantina é uma dioxipurina, logo derivada da substância conhecida como purina. Esse alcalóide tem conhecido efeito estimulante sobre o corpo humano. As principais fontes cafeína na alimentação humana são o café, mate e guaraná. Possui sabor amargo e um aroma de nozes ou castanhas, podendo ou não mostrar sensação de adstringência. Na análise sensorial, a cafeína tem o efeito interessante de mascarar o sabor caracterizado como “rio” que provem dos ácidos clorogênicos (DUARTE et al., 2010; FARAH et al., 2006; PINO; VEGRO, 2008).

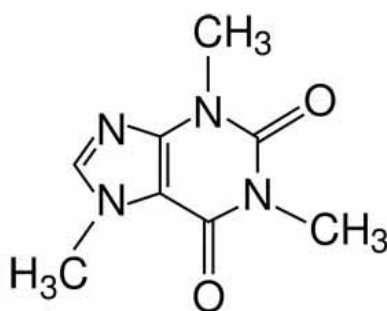


Figura 3: Molécula de cafeína.

Fonte: Site:

http://www.labspaces.net/109170/High_caffeine_consuming_boys_get_greater_rush_from_caffeine_than_girls

Duarte, Pereira e Farah (2010) encontraram valores de aproximadamente 1,05 à 1,53 g/100g de cafeína, e 1,12 à 1,54 g/100g de cafeína na matéria seca de grãos crus processados pela via úmida e via semi-seca respectivamente, utilizando extratos metanólicos via técnica de cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

A perda de cafeína após a torra é cerca de 38% para a amostra de café bebida mole e 29% para a amostra de café bebida rio. Estudos indicam que a perda de cafeína durante a torra se deve à migração desse alcalóide junto ao vapor de água, que ocorre devido à maior solubilidade desse composto em água com o aumento da temperatura (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005).

2.5. Avaliação da atividade antioxidante

Existe uma grande diversidade de métodos para medir atividade antioxidante dos alimentos ou das amostras biológicas. A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro* aplicado atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais são capturados ao ser adicionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais livres, ou então do consumo de oxigênio por esta e/ou a formação de produtos de oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002).

O método do potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) não é baseado na capacidade de captura de radicais livres, mas sim na habilidade de redução do Ferro. Em meio ácido o complexo férrico tripiridiltiazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, causando um aumento na absorbância a 595 nm. A absorbância final é interpolada em uma curva padrão de Trolox, e os resultados são expressos como TE (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

2.6. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (CE), método de separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo elétrico, é um processo que tem sido extensivamente utilizado, principalmente no campo da bioquímica, desde a década de 80.

A CE oferece diversas vantagens na análise de alimentos como baixo consumo de reagentes e de volume de amostra, mínima geração de resíduos, completa automatização, alta eficiência e poder de resolução, além de curtos tempos de análises, quando comparadas a outras técnicas analíticas.

O capilar é feito de sílica fundida revestido com poliamida, o interior do capilar é preenchido com uma solução tampão chamada de eletrólito. Os compostos são injetados, através de injeção eletrocinética ou hidrodinâmica, dentro da capilar. Nas extremidades do capilar é aplicada uma diferença de potencial que gera um campo eletromagnético, esse campo cria um fluxo eletrosmótico responsável pela migração do tampão e dos compostos dentro do capilar. A separação dos compostos é efeito da interação entre a amostra, o eletrólito e a parede interna da capilar. A detecção é realizada por um detector universal ou específico. O detector universal mede a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação ao solvente como o índice de refração ou condutividade. O detector específico mede uma propriedade específica do soluto, como amperometria, radiometria, fluorescência ou absorção de luz. Esse método permite quantificar e identificar os compostos contidos dentro de uma pequena amostra aquosa (TAVARES, 1995; FERNANDEZ et al., 2010; SILVA et al., 2007).

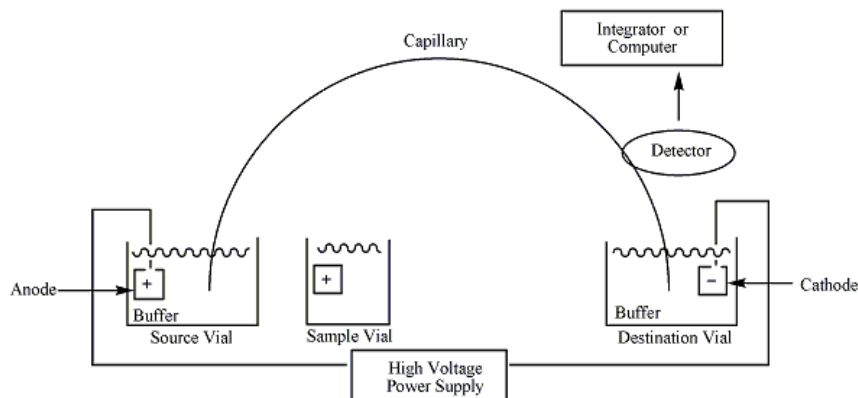


Figura 4: Diagrama esquemático da eletroforese capilar

Fonte: Site: http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis

A técnica de CE é eficiente na análise de ácidos orgânicos de baixa massa molecular e exige pouco pré-tratamento das amostras. A detecção UV direta permite a identificação de ácidos orgânicos que não seriam detectáveis pelo modo indireto e apresenta boa precisão e alta sensibilidade (Galli; Barbas, 2004).

A CE é uma técnica versátil que permite analisar simultaneamente os 12 isômeros de CGA e as xantinas com boa confiabilidade. Esse método é de baixo custo e possui boa precisão, porém é pouco difundido o que pode ser averiguado pelo número maior de publicações científicas que utilizam a técnica de HPLC (MARIA; MOREIRA, 2004).

Fernandez et al., (2010) alertaram que apenas 1% das publicações científicas relacionadas com o café apresentam dados obtidos por CE, nas pesquisas predomina o uso da técnica de HPLC. Afirmaram que não é o suficiente ter uma ideia a respeito dos componentes principais, tornou-se necessário conhecer os componentes minoritários também, uma vez que todos os compostos participam das características organolépticas da bebida. Nesse sentido a CE pode fornecer dados complementares aos demais métodos analíticos, em relação aos diversos compostos fenólicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Quantificar os compostos bioativos, cafeína e ácido clorogênico, e analisar a atividade antioxidante *in vitro* do grão de café cru.

3.2. Objetivos específicos

Determinar o teor de fenólicos totais *in vitro*, através do método de Folin-Ciocalteu nos extratos de grãos de café cru.

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, através dos métodos 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH) e potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) nos extratos de grãos de café cru.

Quantificar os compostos de interesse, cafeína e ácido clorogênico, utilizando a técnica da eletroforese capilar nos extratos de grãos de café cru.

Quantificar os teores de umidade e compostos voláteis, e resíduo mineral fixo nas amostras moídas de grãos de café cru.

4. Materiais e Métodos

4.1. Características das amostras

As amostras de grãos de café cru foram fornecidas pela Cooperativa Regional Agropecuária de Santa Rita do Sapucaí (CooperRita), Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brasil. Essas amostras de café cru da espécie *Coffea arabica* foram previamente classificadas quanto à bebida pelo Departamento de Café da CooperRita como sendo de qualidade mole, dura, riada e rio.

As frutas de café foram colhidas dentro do período de Maio a Setembro do ano de 2010, oriundos da safra 2009/2010. Após a colheita, os frutos foram secos por via seca artificial em forno, vertical ou forno rotativo. O clima do município é do tipo subtropical de altitude, Cwb na classificação climática de Koppen, caracterizado por um clima temperado úmido com inverno seco e verão ameno. A temperatura ao longo do cultivo da safra 2009/2010 variou de 22°C no verão e 12°C no inverno. A espécie cultivada é o *Coffea arabica* das variedades catuaí e mundo novo. O município de Santa Rita do Sapucaí está localizado em uma latitude de 22°15'07" Sul e longitude de 45°42'10" Oeste. A altitude média do cultivo cafeeiro é 820 m. Há o predomínio de latossolo no município (CooperRita, 2011; EMATER-MG, 2011).

A colheita é realizada pelos agricultores, cooperados da CooperRita, que também são responsáveis pelo beneficiamento do café. Quando se fala em beneficiamento do café, faz-se referência às etapas de despolpar o grão, pela via seca, semi-úmida ou úmida, e depois secar o grão, em terreiro aberto, forno ou em local parcialmente sombreado. Os grãos são separados em sacos não-reutilizáveis de 60 kg e transportados via caminhão ao armazém da cooperativa localizada na rodovia. O caminhão, ao chegar, é pesado e o número de sacos é registrado, depois os sacos de café são descarregados e organizados por agricultor e lote. As amostras são recolhidas de acordo com a quantidade de café colhido e número de diferentes lotes, ou glebas, do agricultor, e enviadas

ao departamento de café da CooperRita, no centro da cidade. Na central da cooperativa, o grão de café é classificado segundo seu tipo e bebida, esses dois fatores são anotados junto a outros quesitos em um laudo de classificação, cuja informação servirá de parâmetro para a organização e venda do café cru. Após a classificação, o café passa pelo processo de perda de identidade, referindo-se a separação das amostras pelos parâmetros do laudo de classificação e não pelo agricultor. Vale lembrar que o saco de café no armazém continua separado pelo nome do cooperado, sendo esse dado também registrado no departamento de café, tornando possível localizar rapidamente a amostra no departamento de café e o saco no armazém. A cooperativa vende o grão de café como *commodity* segundo seu tipo e bebida de acordo com a bolsa de valores.

Essa pesquisa utilizando amostras de grãos de café cru foi realizada no Laboratório de Química de Alimentos e no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis-SC.

4.2. Equipamentos e reagentes

Foram utilizados os seguintes equipamentos para a realização dessa pesquisa: moinho analítico (IKA modelo A11), geladeira, freezer, falcon de 13 mL e 45 mL, banho maria de ultra-som (USC-1400 Unique), centrifuga (Centrifugador Excelsa 3, Fanem Ltda, São Paulo, Brasil), pipeta automática, balão volumétrico de 10 mL, 20 mL e 50 mL, cubeta de 10 mm, espectrofotômetro (Hewlett-Packard modelo HP 8452A Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK), eppendorf de 2 mL, seringa com filtro acoplado, vial de 500 µL, eletroforese capilar (Agilent Technologies HP 7100), balança analítica (Electronic Balance, FA-2104N, BioPrecisa), estufa, forno, mufla.

Foram utilizados os seguintes reagentes de grau de padrão analítico para a realização dessa pesquisa: metanol (Vetec), água deionizada, reativo Folin-Ciocalteu (Fulka), carbonato de sódio (Vetec), ácido gálico (Sigma Aldrich), 2,2-difenil-1-picrildrazil, ácido ascórbico (Vetec), cloreto férrico (Vetec), ácido cítrico (Vetec), 2,4,6-tripirydyl-s-triazine, hidrocloreto (Sigma Aldrich), trolox (Sigma Aldrich), ácido difenil acético, padrão de cafeína, padrão de ácido clorogênico, tetraborato de sódio, dodecil sulfato de sódio, acetonitrila.

4.3. Preparo das amostras

Cada uma das 4 amostras de café cru foi separada de modo aleatório em 3 porções de aproximadamente mesmo peso e volume dentro de sacos plásticos.

Uma parte de cada amostra contida em cada saco plástico foi moída em moinho analítico (IKA modelo A11) no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CCA/UFSC à temperatura ambiente de 23°C. Foi tomada a precaução de moer e descartar uma pequena porção da amostra para limpar o moinho de possíveis impurezas ou resíduos da amostra anterior antes coletar a amostra moída que seria utilizada nos experimentos.

Os grãos crus inteiros foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em freezer à uma temperatura de -18°C, afim de preservar as características físico-químicas da matéria prima. Uma porção de cerca de 30 mL de cada amostra moída foi acondicionada em falcon de 45 mL e armazenada em freezer à uma temperatura de -18°C, para evitar a degradação química dos compostos de interesse. O restante de cada amostra moída foi acondicionada em saco plástico e armazenada em geladeira, não necessitando de maiores cuidados pois logo seriam utilizados na determinação do teor de umidade e compostos voláteis, e resíduo mineral fixo.

As amostras moídas contidas em falcon armazenadas em freezer foram utilizadas nos ensaios de fenólicos totais, DPPH, FRAP e CE. As amostras moídas contidas em sacos plásticos armazenadas em geladeira foram utilizadas para a determinação do teor de umidade e compostos voláteis, e resíduo mineral fixo.

4.4. Preparo dos extratos

Foram realizadas 3 extrações para cada uma das 4 amostras de café cru segundo o método descrito por Kim et al. (2002) e adaptado a partir de Bouayed, Hoffmann e Bohn (2011).

Misturas com cerca de 5,0 g de café moído e 20 mL de metanol a 100% foram preparadas em falcons de 45 mL.

Essas misturas foram deixadas em banho de ultra-som (USC-1400 Unique) por 30 min, para a reação de extração dos fenólicos. As misturas foram centrifugadas (Centrifugador Excelsa 3, Fanem Ltda, São Paulo, Brasil) durante 20 min em uma rotação de 3.000 rpm, e o sobre-nadante de cada falcon foi transferido para balões de 20 mL.

O processo de extração foi repetido, para melhorar a eficiência da recuperação dos fenólicos, usando 20 mL de metanol a 80%, e mantendo as mesmas condições de banho de ultra-som e centrifugação. Esse segundo sobre-nadante foi somado ao sobre-nadante anterior para um volume total de aproximadamente 40 mL e transferidos para balões de 50 mL, onde foram homogeneizados.

O solvente foi removido por evaporação rotativa à temperatura de 40°C para um volume final com cerca de 4 mL. Esse modo de evaporação proporciona melhor troca de calor e homogeneidade na evaporação do extrato. Esse volume de concentrado foi dissolvido em 10 mL de metanol a 100% e diluído para um volume final de 20 mL. Essa mistura foi centrifugada e o sobre-

nadante foi armazenado à -80°C até o momento de realizar as análises para evitar a degradação dos compostos fenólicos.

Esses 12 extratos de café cru foram utilizados para os ensaios de fenólicos totais, sequestro de radicais DPPH e potencial redutor FRAP.

4.5. Determinação do teor de fenólicos totais

A concentração de todos os compostos fenólicos existentes dentro dos extratos das amostras foi quantificada segundo o método descrito por Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Foram preparadas 9 amostras para cada um dos 4 tratamentos. Como início do procedimento, 2 mL de água deionizada foi pipetada em cada balão volumétrico de 10 mL, e depois 100 µL do extrato de cada amostra foi pipetada. Em seguida foi adicionado 0,5 mL do reativo Folin-Ciocalteu aos balões contendo extrato, que foram agitados manualmente por cerca de 5 segundos.

Após 1 min foi adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio (NaCO_3) à 20%, e as misturas foram novamente agitadas. As misturas foram então diluídas com água deionizada até o volume total de 10 mL e armazenadas à temperatura ambiente de 23°C ao abrigo da luz por 2 horas.

Após esse período de incubação, as amostras foram transferidas para cubetas de 10 mm e foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 765 nm utilizando um espectrofotômetro (Hewlett-Packard modelo HP 8452A Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). O teor de fenólicos totais foi expresso em microgramas de equivalente de ácido gálico (GAE) por grama de massa fresca (mF) e quantificado de acordo com uma curva padrão de ácido gálico elaborada com diferentes concentrações desse ácido.

4.6. Determinação do poder de sequestrar radicais livres pelo método 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH)

Na avaliação da capacidade das amostras de café em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH), foi utilizado o método descrito por Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995) e modificado por Kim et al. (2002).

A solução de DPPH foi preparada pela dissolução de 0,0394 g de DPPH em 10 mL de metanol (CH_3OH) à 100% para uma concentração de 0,1 miliMolar. Essas soluções foram diluídas em 1:100 de metanol 80%, de modo a ajustar a absorbância inicial de 515 nm para um valor de 0,800.

Foi pipetado 2,9 mL do radical DPPH em cada falcon e depois transferido para cubetas de 10 mm. A absorbância A_0 foi medida no comprimento de onda de 515 nm. Depois foi adicionado 100 μL do extrato das amostras e as cubetas foram deixadas em repouso ao abrigo da luz por 30 min.

Após esse tempo de repouso, foi feito a medida da absorbância a 515 nm utilizando um espectrofotômetro (Hewlett-Packard modelo HP 8452A Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) para obter a absorbância final. Como referência foi preparada uma curva padrão de ácido ascórbico e os valores obtidos foram expressos em micromol de equivalente de ácido ascórbico (AAE) por grama de massa fresca (mF).

4.7. Determinação do poder redutor pelo método potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Para determinar a capacidade redutora das amostras de café cru, foi utilizado o ensaio de potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP). Essa metodologia foi descrita por Benzie e Strain (1993) com modificações por Arnous et al. (2002).

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 3 miliMolar foi elaborada a partir de 0,1216 g de FeCl_3 diluído em 50 mL de ácido cítrico a 5 miliMolar, este preparado com 0,1050 g de ácido cítrico diluído em 100 mL de água destilada.

A solução de 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) foi elaborada com 0,0780 g de TPTZ diluído em 250 mL de hidrocloreto (HCl) a 0,05 m, este preparado a partir de 2 mL de HCl diluído em 500 mL de água deionizada.

Foram preparadas 9 amostras para cada um dos 4 tratamentos. Foi pipetado 200 μL de FeCl_3 a 3 miliMolar e 200 μL de extrato das amostras, em falcons de 13 mL. Foram preparadas 3 provas em branco com 200 μL de FeCl_3 3 miliMolar e 200 μL de metanol.

Os falcons foram homogeneizados e centrifugados em centrífuga (Centrifugador Excelsa 3, Fanem Ltda, São Paulo, Brasil). Depois os mesmos foram sonicados em banho maria a 37°C por 30 min. Após esse período, foi adicionado 3,6 mL de TPTZ em cada falcon e deixados em repouso por 10 min.

As amostras foram transferidas para cubetas de 10 mm para a leitura da absorbância a 620 nm de comprimento de onda medidas em um espectrofotômetro (Hewlett-Packard modelo HP 8452A Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). Os valores obtidos foram calculados de acordo com uma curva padrão de trolox, previamente calibrada, e expressos em micromol de equivalente de trolox (TE) por grama de massa fresca (mF).

4.8. Eletroforese capilar

Para a utilização da técnica de eletroforese capilar (CE) foram realizadas 3 extrações para cada uma das 4 amostras de café cru, e cada extração foi injetada 3 vezes.

Foram preparadas misturas com cerca de 1,00 g de café cru moído diluído em 10 mL de água deionizada dentro de falcons de 13 mL. Os falcons foram colocados em banho maria de ultra-som (USC-1400 Unique) durante 15 min, para a extração de cafeína e ácido clorogênico. Depois, os falcons foram centrifugados (Centrifugador Excelsa 3, Fanem Ltda, São Paulo, Brasil) por 5 min em uma rotação de 3.000 rpm. Uma porção de cada sobre-nadante foi filtrado, com filtro acoplado a uma seringa, e transferido para um eppendorf de 2 mL. A partir dos extratos filtrados contidos em eppendorfs foram elaboradas amostras diluídas em água deionizada na proporção de 1:10 em vials de 500 µL para a injeção das amostras.

Uma vez preparados, os 12 vials foram colocados dentro do carrossel da eletroforese capilar (Agilent Technologies HP 7100). Para a corrida eletrocínética foi utilizado um capilar de sílica fundida revestida de poliamida com as dimensões de 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento até o detector e 50 µm de diâmetro interno. A injeção foi do tipo hidrodinâmica, feita pelo *outlet* (8,5 cm até o detector), com polaridade negativa e pressão de 50 mbar por 5 segundos. Cada um dos 12 extratos foi injetado 3 vezes. A separação foi efetuada com tensão de -30 kV. A temperatura foi mantida em 25°C. O eletrólito foi composto por 10 miliMolar de tetraborato de sódio (TBS), 50 miliMolar de dodecil sulfato de sódio (SDS) e acetonitrila (ACN) à 5% de concentração. O padrão interno usado foi o ácido difenil acético (DAA) à 100 µg/g diluído em metanol à 20% de concentração. A detecção dos compostos foi realizada via detecção direta por um fotodetector que mede a absorção da luz no ultravioleta ao visível (UV/VIS) com um *diode array detector* (DAD) que detecta ondas no comprimento de 190 nm à 600 nm, sendo a leitura feita no comprimento de onda 200 nm.

4.9. Determinação do teor de umidade e compostos voláteis

O teor de umidade e compostos voláteis das amostras foi obtido por via gravimétrica pelo cálculo da perda de peso das amostras após sua secagem dentro de uma estufa (AOAC, 2005).

Para cada uma das 4 amostras foram realizadas 6 pesagens, 2 pesagens para a amostra contida em cada um dos 3 sacos plásticos. Cadinhos de alumínio foram previamente secos em estufa à uma temperatura de 80°C durante 4 horas e depois pesados em uma balança analítica (Electronic Balance, FA-2104N, BioPrecisa) tendo seus respectivos pesos obtidos em gramas.

Em cada cadinho foi pesado cerca de 5,0 g de amostra de café moído e depois foram todos colocados em estufa à 105°C durante mais de 12 horas para a evaporação dos compostos voláteis.

Depois desse período de secagem, os cadinhos com as amostras secas foram pesados em uma balança analítica (Electronic Balance, FA-2104N, BioPrecisa) e devolvidos à estufa, com auxílio de um dessecador. Foram realizadas mais 2 pesagens, com um período de 12 horas dentro da estufa entre elas, para um total de 3 pesagens, afim de verificar a estabilidade do teor de umidade e compostos voláteis nas amostras. O teor de umidade e compostos voláteis das amostras de cada cadinho de alumínio foi obtido pelo cálculo da diferença percentual entre o peso inicial da amostra e o peso da amostra seca. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade e compostos voláteis por massa fresca.

4.10. Determinação do teor de resíduo mineral fixo

Para a determinação do teor de resíduo mineral fixo das amostras foi calculado a perda de peso das amostras após a queima da matéria orgânica (AOAC, 2005).

Foram feitas 6 pesagens para cada amostra. Cadinhos de porcelana previamente secos em estufa à temperatura de 80°C durante 4 horas, foram pesados em uma balança analítica (Electronic Balance, FA-2104N, BioPrecisa) e seus respectivos pesos expressos em gramas.

Cerca de 5,0 g de café moído foram pesadas em cada cadinho e as amostras foram levadas ao aquecedor à uma temperatura de 300°C até cessar a emissão de fumaça. Depois desse procedimento, as amostras foram colocadas dentro de uma mufla à uma temperatura de 550°C até a queima completa da matéria orgânica, levando cerca de 4 horas.

Após a queima completa das amostras, os cadinhos de porcelana contendo cinzas foram novamente pesados, com auxílio de um dessecador, em balança analítica (Electronic Balance, FA-2104N, BioPrecisa). Para obter o valor percentual do teor de resíduo mineral fixo das amostras, foi calculada a diferença entre o peso inicial das amostras e o peso das cinzas após a queima das amostras. Os resultados foram expressos em porcentagem de resíduo mineral fixo por massa fresca.

4.11. Análise estatística

Os resultados dos ensaios de teor de fenólicos totais, poder de sequestro de radicais DPPH, poder de redutor FRAP, CE, teor de umidade e compostos voláteis, e teor de resíduo mineral fixo foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa SASM-Agri. Os resultados dos 4 tratamentos foram submetidos à análise de variância em delineamento de blocos casualizados, e as médias submetidas à separação de médias pelo teste de Tukey com grau de significância de 5%.

5. Resultados e Discussão

5.1. Determinação do teor de fenólicos totais, poder de sequestrar radicais livres e poder redutor

A quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos de grãos de café cru foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. Foram realizados 9 ensaios para cada um dos 4 tratamentos. A tabela 1 abaixo apresenta as médias de fenólicos totais por tratamento, mensurados em microgramas de equivalente de ácido gálico por grama de massa fresca da amostra.

Tabela 1: Teor de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu em extratos de grãos de café cru.

Amostra	Teor fenólico total ($\mu\text{gGAE/gm F}$)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	117,46 a	18,18	15,48
Bebida dura	157,76 a	62,76	39,78
Bebida riada	129,49 a	31,81	24,56
Bebida rio	128,06 a	28,09	21,93

GAE – equivalente de ácido gálico. mF – massa fresca. t = 4. n = 9.

A capacidade antioxidante das amostras de café cru foi determinada segundo o método do DPPH. O 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH) é um radical livre estável que, ao entrar em contato com compostos antioxidantes, reage com esses antioxidantes e é convertido para α,α -difenil- β -picrildrazil. Nesse ensaio o grau de descoloração da amostra indica sua capacidade de sequestrar radicais livres. Foram realizados 9 ensaios para cada um dos 4 tratamentos. A tabela 2 abaixo mostra os valores médios da atividade antioxidante de cada tratamento medido em microgramas de AAE por grama de massa fresca da amostra.

Tabela 2: Sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picridrazil (DPPH) em extratos de grãos de café cru.

Amostra	Atividade antioxidante (µgAAE/gm F)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	633,86 a	52,02	8,20
Bebida dura	624,52 a	36,81	5,89
Bebida riada	632,46 a	58,80	9,29
Bebida rio	620,66 a	42,12	6,78

AAE – equivalente de ácido ascórbico. mF – massa fresca. t=4. n=9.

O potencial de redução das amostras de café cru foi determinado segundo o método do potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP), onde a capacidade de redução da amostra equivale a sua capacidade de reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}) para o estado de ferro ferroso (Fe^{2+}). Foram realizados 9 ensaios para cada um dos 4 tratamentos. A tabela 3 abaixo mostra a média de potencial de redução de cada tratamento quantificado em microgramas de equivalente de trolox por grama de massa fresca da amostra.

Tabela 3: Potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) em extratos de grãos de café cru.

Amostra	Potencial redutor (µgTE/gm F)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	495,88 a	59,33	11,96
Bebida dura	503,66 a	37,33	7,41
Bebida riada	464,01 a	71,69	15,45
Bebida rio	468,29 a	40,62	8,67

TE – equivalente de trolox. mF – massa fresca. t=4. n=9.

Não houve diferença significativa no teor de fenólicos totais, atividade antioxidante ou poder de redução entre diferentes qualidades de bebida de grãos de café cru. Não foi possível estabelecer uma correlação entre os fenólicos totais, atividade antioxidante ou poder redutor com a qualidade de bebida do grão cru de café.

Estudos recentes (FARAH et al., 2006) indicam que o teor de ácidos fenólicos diminui conforme a qualidade da bebida aumenta.

Franca, Mendonça e Oliveira (2005) não encontraram uma variação significativa entre amostras de diferentes qualidades de grãos.

Farah e Donangelo (2006) afirmam que a correlação de CGA e seus isômeros com a qualidade do grão é controverso. É possível que o aumento do teor de CGA esteja associado com uma qualidade ruim devido à ação da enzima polifenol oxidase que gera compostos prejudiciais a qualidade a partir do CGA e seus isômeros. Os mesmos autores levantam a hipótese de que pode existir um teor máximo limite para o CGA.

Pinto et al. (2002) não encontraram uma variação no teor de polifenóis em grãos crus de café. Constataram que há uma ausência de valores fixos que indiquem uma qualidade melhor ou pior. Esses valores são difíceis de serem estabelecidos devido às variações genéticas entre variedades cultivadas, alterações climáticas de um ano para outro e estágio de maturação dos grãos no momento da colheita.

É possível que cada composto fenólico no grão de café tenha uma curva de teor ao longo do tempo que não coincida com o a maturação do fruto e grão. Os diferentes compostos fenólicos podem contribuir em graus diferentes à atividade antioxidante e às características organolépticas da bebida de café. A rota metabólica da biosíntese de fenólicos na planta do cafeeiro é afetada pela interação entre as condições climáticas e a variedade genética.

5.2. Eletroforese capilar

5.2.1 Escolha do padrão interno

A utilização de um padrão interno tem como finalidade reduzir o erro de injeção do equipamento e aumentar a precisão dos dados (Watzig, Degenhardt & Kunkel, 1998). Para a escolha de um padrão interno, a mobilidade e comportamento devem ser usados como critério. A mobilidade dos analitos da amostra e do padrão interno deve ser similar dentro do mesmo eletrólito. Sendo assim alguns compostos foram avaliados quanto a essas condições de análise, dentre eles o diclofenaco sódico, fenofibrato e ácido naftil acético. O ácido difenil acético (DAA) foi escolhido como padrão interno, por apresentar características e mobilidade semelhantes às dos analitos das amostras de café, e por não estar presente no extrato de grão cru de café.

Na figura 1 é apresentado um eletroferograma dos padrões. Foi utilizado um capilar de 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento até o detector e 50 µm de diâmetro interno. A injeção foi feita pela extremidade mais próxima ao detector, logo 8,5 cm, com uma pressão de 50 mbar durante 3 segundos, temperatura de 25°C, tensão de -30 kV, detecção em 200 nm de comprimento de onda e tempo de corrida de 2 min.

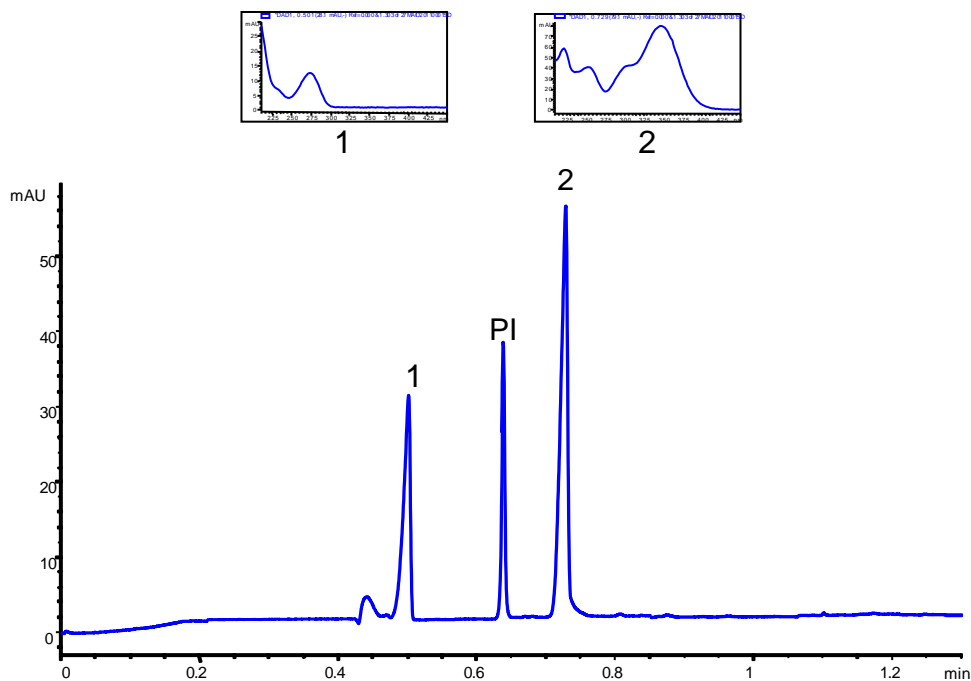


Figura 5: Eletroferograma da amostra dos padrões de cafeína, DAA e CGA com seus picos e respectivos espectros. 1-cafeína. PI-ácido difenil acético. 2-CGA. Amostra - Extrato aquoso de grão cru moído. Eletrólito -10 mM TBS, 50 mM SDS, ACN 5 %. Padrão interno - DAA, 100 µg/g em metanol 20 %. Capilar - Sílica fundida revestida de poliamida, L=48,5 cm, DI=50 µm. Injeção - hidrodinâmica pelo *outlet*, P=-50 mbar, t=5 seg. Tensão=-30 kV. Detecção UV/VIS direta, $\lambda=200$ nm.

5.2.2. Avaliação do desempenho do método

Os padrões de cafeína e ácido clorogênico foram analisados em diferentes concentrações com intervalos regulares, para a elaboração de curvas de análise. Os resultados das curvas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros das curvas analíticas para os padrões de cafeína e ácido clorogênico.

Analito	Faixa linear (mg/L)	a	B	Coefficiente de determinação (R^2)	Erro padrão da regressão (Ep de r)
Cafeína	20 – 70	$0,0220 \pm 0,0006$	$0,0101 \pm 0,0305$	0,9967	0,0265
Ácido clorogênico	230 – 280	$0,0116 \pm 0,0005$	$-0,0940 \pm 0,1222$	0,9949	0,0199

a – coeficiente angular. b – coeficiente linear. Equação – $A=aC+b$, onde A=área em unidade arbitrária e C=concentração em mg/L. R^2 =coeficiente de determinação. n=6.

As curvas de regressão apresentaram coeficiente de determinação elevados ($R^2 \geq 0,9949$), erro padrão de regressão baixos (Ep de $r \leq 0,0265$) e ausência de tendência nos gráficos de resíduos, estando os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram estimados pela relação entre sinal e ruído (S/N). O LOD e LOQ foram calculados a partir da média dos valores de três eletroferogramas, sendo a concentração que gera $S/N = 3$ para o LOD, e $S/N = 10$ para o LOQ. A variação da área corrigida em função da concentração demonstrou relação linear para a cafeína e ácido clorogênico. A tabela 5 abaixo mostra o LOD e LOQ da cafeína e ácido clorogênico no padrão e amostra.

Tabela 5: Limites de detecção e determinação obtidos pela relação sinal/ruído.

Análito	Relação sinal/ruído (S/N)			
	Padrão interno		Amostra	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Cafeína	$1,008 \pm 0,178$	$3,361 \pm 0,592$	$0,742 \pm 0,185$	$2,475 \pm 0,619$
Ácido clorogênico	$2,287 \pm 0,383$	$7,625 \pm 1,279$	$1,227 \pm 0,298$	$4,090 \pm 0,994$

LOD – limite de detecção. LOQ – limite de quantificação. $n=3$.

5.2.3. Quantificação das amostras

Os extratos aquosos filtrados preparados a partir de grãos moídos de café cru tiveram seus teores de cafeína e ácido clorogênico identificados e quantificados pela técnica de CE. O teor de cada composto foi quantificado pela integração da área do pico de seus picos de absorbância, sendo a leitura realizada por um fotodetector do tipo UV/VIS DAD. Os resultados obtidos estão representados abaixo nas figuras 2, 3, 4 e 5 acompanhadas dos espectros de detecção de seus principais picos de absorbância, e nas tabelas 6 e 7.

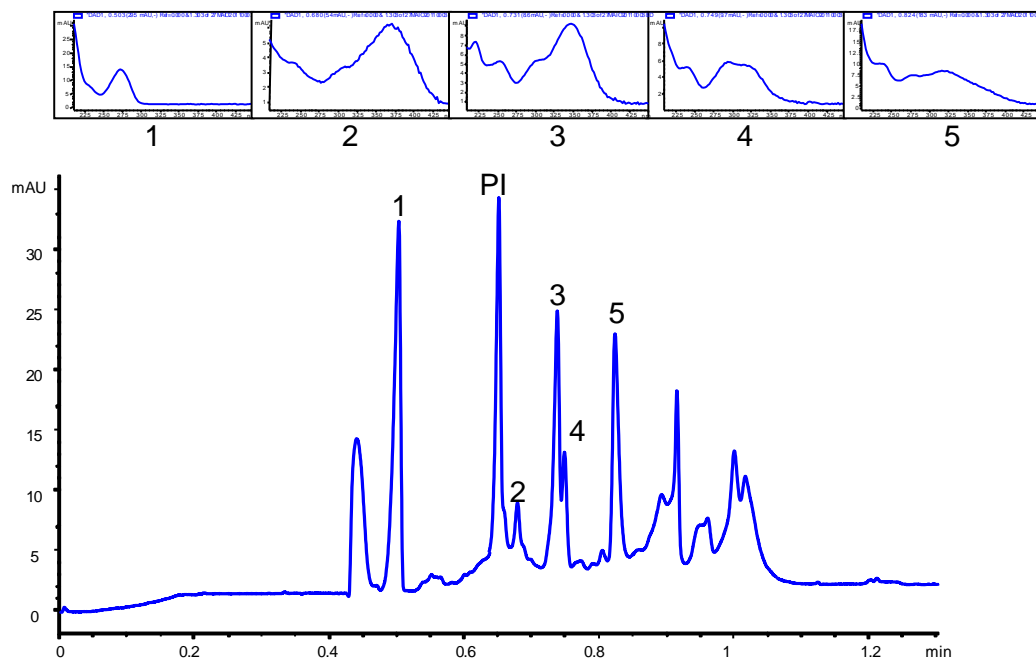


Figura 6: Eletroferograma da amostra de bebida mole com seus picos e respectivos espectros. 1-caféina. PI-DAA. 2-derivado de CGA. 3-CGA. 4-derivado de CGA. 5-derivado de CGA. Amostra - Extrato aquoso de grão cru moído. Eletrólito -10 mM TBBS, 50 mM SDS, ACN 5 %. Padrão interno - DAA, 100 µg/g em metanol 20 %. Capilar - Sílica fundida revestida de poliamida, L=48,5 cm, DI=50 µm. Injeção - hidrodinâmica pelo *outlet*, P=-50 mbar, t=5 seg. Tensão=-30 kV. Detecção UV/VIS direta, $\lambda=200$ nm.

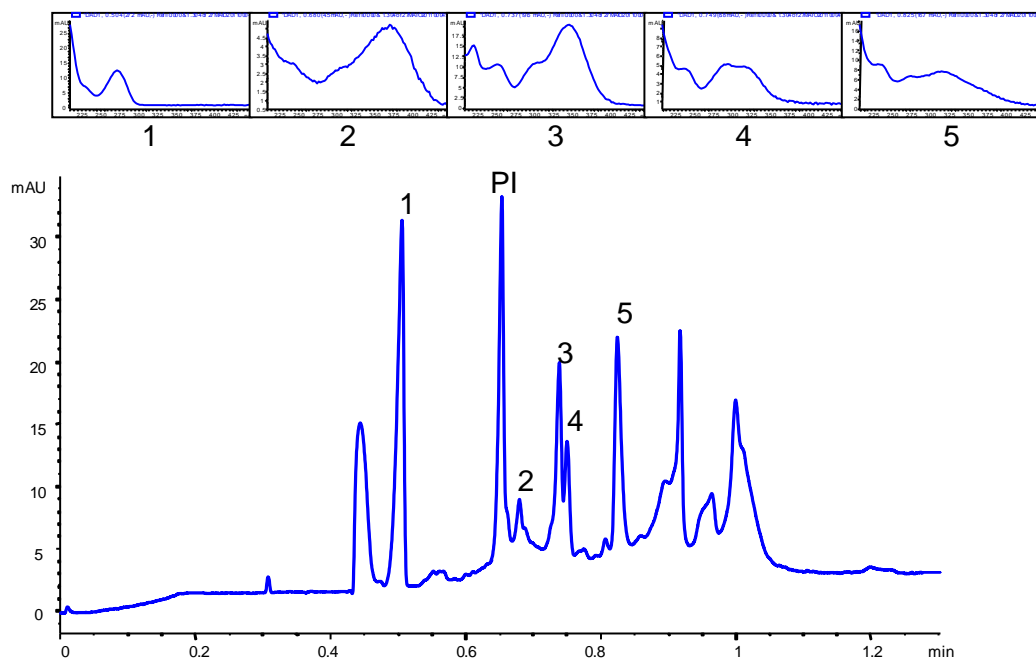


Figura 7: Eletroferograma da amostra de bebida dura com seus picos e respectivos espectros. 1-caféina. PI-DAA. 2-derivado de CGA. 3-CGA. 4-derivado de CGA. 5-derivado de CGA. Amostra - Extrato aquoso de grão cru moído. Eletrólito -10 mM TBBS, 50 mM SDS, ACN 5 %. Padrão interno - DAA, 100 µg/g em metanol 20 %. Capilar - Sílica fundida revestida de poliamida, L=48,5 cm, DI=50 µm. Injeção - hidrodinâmica pelo *outlet*, P=-50 mbar, t=5 seg. Tensão=-30 kV. Detecção UV/VIS direta, $\lambda=200$ nm.

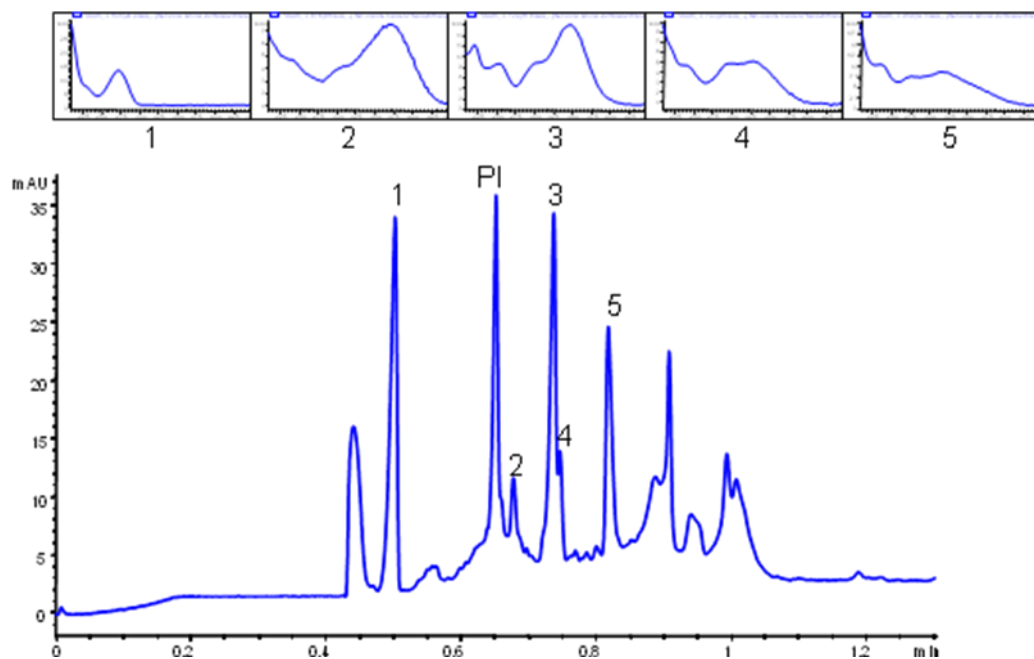


Figura 8: Eletroferograma da amostra de bebida riada com seus picos e respectivos espectros. 1-cafeína. PI-DAA. 2-derivado de CGA. 3-CGA. 4-derivado de CGA. 5-derivado de CGA. Amostra - Extrato aquoso de grão cru moído. Eletrólito -10 mM TBS, 50 mM SDS, ACN 5 %. Padrão interno - DAA, 100 µg/g em metanol 20 %. Capilar - Sílica fundida revestida de poliamida, L=48,5 cm, DI=50 µm. Injeção - hidrodinâmica pelo *outlet*, P=-50 mbar, t=5 seg. Tensão=-30 kV. Detecção UV/VIS direta, $\lambda=200$ nm.

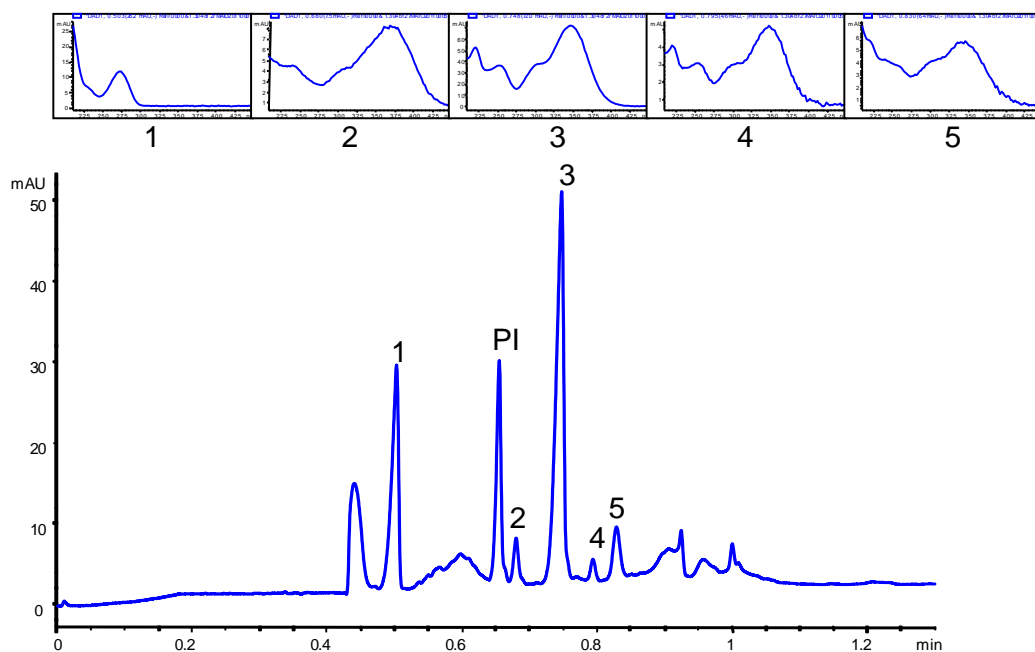


Figura 9: Eletroferograma da amostra de bebida rio. 1-cafeína. PI-DAA. 2-derivado de CGA. 3-CGA. 4-derivado de CGA. 5-derivado de CGA. Amostra - Extrato aquoso de grão cru moído. Eletrólito -10 mM TBS, 50 mM SDS, ACN 5 %. Padrão interno - DAA, 100 µg/g em metanol 20 %. Capilar - Sílica fundida revestida de poliamida, L=48,5 cm, DI=50 µm. Injeção - hidrodinâmica pelo *outlet*, P=-50 mbar, t=5 seg. Tensão=-30 kV. Detecção UV/VIS direta, $\lambda=200$ nm.

As tabelas 6 e 7 abaixo apresentam os teores de cafeína e ácido clorogênico, respectivamente, presentes nos extratos aquosos de grãos de café cru quantificados via técnica de CE.

Tabela 6: Teor de cafeína, em extratos de grãos de café cru utilizado a técnica da eletroforese capilar.

Amostra	Teor de cafeína ($\mu\text{g/gm F}$)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	64,81 a	4,26	6,58
Bebida dura	66,69 a	7,63	11,44
Bebida riada	64,01 a	5,35	8,36
Bebida rio	64,92 a	2,45	3,78

mF – massa fresca. t=4. n=9.

Tabela 7: Teor de ácido clorogênico, em extratos de grãos de café cru utilizado a técnica da eletroforese capilar.

Amostra	Teor de ácido clorogênico ($\mu\text{g/gm F}$)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	42,55 d	18,45	43,36
Bebida dura	85,96 c	10,68	12,42
Bebida riada	151,94 b	52,75	34,71
Bebida rio	248,24 a	9,48	3,81

mF – massa fresca. t=4. n=9.

Na quantificação do teor de cafeína das amostras de café, não foi observada uma diferença significativa no teor de cafeína nos extratos de grãos de café cru.

Duarte, Pereira e Farah (2010) não encontraram uma variação no teor de cafeína em diferentes processos de secagem, por via úmida e semi-seca. Esse dado foi atribuído ao baixo teor de cafeína no grão e ao período variável que o grão permanece submerso em água no beneficiamento por via úmida.

Farah et al. (2006) observaram um teor maior de cafeína no grão de bebida mole e um menor teor no café de bebida dura. Houve uma pequena correlação desses teores de cafeína com o bom sabor da bebida de café pelo ação da cafeína de esconder o sabor rio do café.

Franca et al (2005) encontraram um teor menor de cafeína em grãos sadios que em grãos defeituosos em grãos de café. Porem Franca, Mendonça e Oliveira (2005) encontraram um teor maior de cafeína em grãos de bebida mole e um teor menor de cafeína em grãos de bebida rio. Foi observada uma diferença significativa no teor de cafeína entre tratamentos e uma correlação positiva do teor de cafeína com a qualidade da bebida de café.

O teor de ácido clorogênico, das amostras de café cru, demonstrou uma variação significativa entre as diferentes qualidades de café. Foi observada uma correlação inversa entre o teor de ácido clorogênico e os quatro tipos de bebida de café. O café bebida mole apresentou a menor concentração com uma média de 42 $\mu\text{g/gmF}$, enquanto que a maior concentração foi do café bebida rio com em média 248 $\mu\text{g/gmF}$.

Duarte, Pereira e Farah (2010) encontraram teores similares de ácidos clorogênicos totais e de isômeros de ácido clorogênico em grãos secos por via úmida e semi-seca.

Farah et al. (2006) observaram um teor maior de CGA em grãos de café de qualidade inferior. O teor de CGA mostrou uma proporcionalidade inversa à qualidade de bebida do grão. O isômero de CGA, ácido dicafeoilquínico (diCQA), teve uma correlação positiva com a qualidade de grão.

Franca et al. (2005) encontraram um teor menor de 5-ácido cafeoquínico (5-CQA), isômero de CGA em maior concentração, em grãos sadios de café.

Franca, Mendonça e Oliveira (2005) não encontraram diferença no teor de 5-CQA em grãos crus, porém após a torra os grãos de qualidade inferior apresentaram um maior teor de 5-CQA que grãos de melhor qualidade. Esse dado foi atribuído à menor degradação de grãos defeituosos sob as mesmas condições de torra que grãos sadios.

5.3. Determinação do teor de umidade e compostos voláteis

O teor de umidade e compostos voláteis de cada tratamento foi determinado de acordo com a perda percentual de compostos voláteis por amostras moídas de café cru em cadinhos de alumínio. Foram realizadas 6 pesagens diferentes para cada um dos 4 tratamentos. Cada cadinho com amostra foi pesado 3 vezes, com um período de secagem em estufa entre as 3 pesagens. Foram utilizadas as médias por tratamento da segunda pesagem, pois essa demonstrou uma secagem mais eficiente. Na tabela 6 abaixo se encontram os valores médios de umidade e compostos voláteis de cada tratamento.

Tabela 8: Teor de umidade e substâncias voláteis em amostras de grãos de café cru moídos.

Amostra	Teor de umidade e compostos voláteis (%)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	9,40 b	0,08	0,93
Bebida dura	9,95 a	0,16	1,67
Bebida riada	10,16 a	0,44	4,36
Bebida rio	8,51 c	0,12	1,49

% – porcentagem da massa fresca. t=4. n=6.

As amostras de grãos crus de café apresentaram uma média de teor de umidade e compostos voláteis de 9,5%. A amostra de bebida riada apresentou o maior teor de 10,1%, e a amostra de bebida rio apresentou o menor teor com 8,5%. Houve uma pequena diferença entre as qualidades de bebidas diferentes. Essa diferença não teve correlação com a qualidade do grão cru de café.

Esses valores não diferem dos valores médios encontrados na literatura de 9% (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005) e de 8,5-13% (CLARKE, 1985) para amostras de café cru de diferentes qualidades. Franca, Mendonça e Oliveira (2005) observaram que a amostra riada apresentou a maior umidade de 9,3% e a amostra rio apresentou a menor umidade de 8,9%.

Essa variação é possivelmente relacionada com o estágio de maturação do fruto e grão na hora da colheita, aos cuidados posteriores à colheita e com o perfil de quais tipos de defeitos são encontrados nos grãos defeituosos.

5.4. Determinação do teor de resíduo mineral fixo

O teor mineral de cada tratamento foi determinado segundo a diferença percentual entre o peso da amostra de café cru moído e o peso da amostra depois da queima de sua matéria orgânica. Foram pesadas 6 amostras para cada um dos 4 tratamentos, em cadinhos de porcelana. Depois da queima dos compostos orgânicos foi realizada uma segunda pesagem para estabelecer o teor de minério das amostras de cada tratamento. Foi utilizada a média do percentual de resíduo mineral fixo por tratamento. A tabela 7 abaixo mostra o valor médio percentual de minerais de cada tratamento.

Tabela 9: Teor de resíduo mineral fixo em amostras de grãos de café cru moídos.

Amostra	Teor de resíduo mineral fixo (%)	Desvio Padrão (σ)	Coefficiente de Variação (CV%)
Bebida mole	3,07 c	0,094	3,067
Bebida dura	3,31 ab	0,193	5,833
Bebida riada	3,14 bc	0,113	3,626
Bebida rio	3,40 a	0,093	2,764

% – porcentagem da massa fresca. t=4. n=6.

As amostras de grãos de café cru demonstraram uma média do teor de resíduo mineral fixo de 3,2%. A amostra de bebida rio teve o maior teor mineral fixo de 3,4%, e a amostra de bebida mole teve o menor teor de resíduo mineral fixo de 3,0%. Esses valores estão um pouco abaixo do encontrado na literatura. Houve uma pequena diferença significativa entre as diferentes bebidas. A diferença entre os grãos de café de diferentes bebidas não teve correlação com a qualidade do grão cru de café.

Franca, Mendonça e Oliveira (2005) encontraram um teor de resíduo mineral fixo de 4-5% em grãos crus e torrados de café, sendo que a amostra de bebida riada obteve o maior teor de 4,9% e a amostra de bebida mole obteve o menor teor de 4,5%. Os mesmos autores relataram que não houve diferença significativa entre amostras de diferentes qualidades.

Essa pequena variação é possivelmente relacionada com o estágio de maturação do fruto e grão na hora da colheita, com o perfil de quais tipos de defeitos são encontrados nos grãos defeituosos e com o aporte de minerais no solo e balanço hídrico durante o enchimento do grão.

6. Conclusões

O teor de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, não apresentou uma variação significativa entre os grãos de diferentes tratamentos.

A atividade antioxidante, pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e potencial redutor FRAP, não variou conforme os grãos de diferentes tratamentos. Houve semelhança entre as proporções do teor de fenólicos totais e poder de redução dos tratamentos.

O teor de cafeína quantificado pela técnica de CE não apresentou uma variação significativa, permanecendo similar entre os grãos de diferentes tratamentos. O teor de CGA variou significativamente e apresentou correlação inversamente proporcional à qualidade do grão, quanto melhor a qualidade da bebida do grão, menor foi o teor de CGA no extrato aquoso.

O teor de umidade e compostos voláteis variou significativamente em grãos de diferentes tratamentos. O teor de resíduo mineral fixo mostrou apenas uma pequena diferença entre os grãos de diferentes tratamentos, não sendo correlacionado com a qualidade do grão.

Não existe uma composição físico-química perfeita do grão de café, muito menos uma qualidade global ideal da bebida de café. Fatores como o clima durante a safra, manejo de cultivo e variedade genética afetam a identidade da matéria prima e do produto final.

7. Considerações finais

É possível que grãos de bebida inferior tenham um teor maior de ácidos clorogênicos originando um sabor e aroma químico ou iodado e sensação de adstringência. Esses sabores e aromas são mascarados pelo sabor amargo e aroma de nozes dos alcalóides, principalmente da cafeína. O fato de grãos serem classificados com qualidade inferior no teste da xícara pode estar relacionado com o teor elevado de ácidos clorogênicos se sobreponem à cafeína e demais alcalóides, devido à presença de grãos defeituosos que sofrem menor perda de ácidos clorogênicos durante a torra.

A torra é um processo complexo físico-quimicamente que pode alterar a qualidade da bebida avaliada no teste da xícara. A interação entre os principais compostos do grão de café é bastante complexa, o que dificulta a elaboração de relações lineares. É preciso um estudo mais detalhado para correlacionar o perfil químico com a análise sensorial, uma vez que a muitas variáveis envolvidas na atividade antioxidante e características organolépticas do café.

Referências Bibliográficas

- ABIC** – Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acesso em 31 de Maio de 2011.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos- uma breve revisão**. Revista Instituto Adolfo Lutz. 2007, v.66, n.1, p.232-240.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S., ROBARDS, K. **Methods for testing antioxidant activity**. Analyst. 2002, 127, 183-198.
- AOAC** – Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. **Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece**. Journal of Food Composition and Analysis. 2002, v. 15, p. 655-665.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay**. Analytical Biochemistry. 1996, v. 239, p. 70-76.
- BLYENY, H. P. A. **Análise comparativa da composição química de cafés do cerrado mineiro e do sul de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004, 91f.
- BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. **Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake**. Food Chemistry. 2011, 128, 14-21.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensm. Wiss. Technol. 1995, v.22, p. 25-30
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento. **Instrução Normativa n. 8, de 11 de junho de 2003. Aprova o regulamento técnico da identidade e de qualidade para a classificação de café beneficiado grão cru**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.ministerio.gov.br/>>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2007.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. **SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan**. Revista Brasileira de Agrocomputação. 2001, V.1, N.2, p.18-24.

Capillary Electrophoresis – Wikipedia. Disponível em:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis>. Acesso em 10 de Julho de 2011.

CARDOSO, A.P.S. **Café: cultura e tecnologia primária.** Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical. 1994, 169p.

CLARKE, R. J. **Water and mineral contents.** In: R. J. Clarke, R. Macrae (Eds.), *Coffee, Vol1: Chemistry* (pp. 42–82). 1985, London: Elsevier Applied Science.

CLIFFORD, M.N. **Chlorogenic acid and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden.** *Journal of the Science Food and Agriculture.* Oxford, 1999, v.79, p.363-372.

Coffeebreak. Espécies e variedades: características influenciam escolha. Disponível em: <<http://www.coffeebrak.com.br/ocafezal>>. Acesso em 30 de Maio de 2011.

CooperRita – Cooperativa Regional Agropecuária de Santa Rita do Sapucaí. Disponível em: <<http://www.cooperrita.com.br/>>. Acesso em 30 de Abril de 2011.

CORREA, M Pio. . **Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro (RJ): Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984, 6v.

DAVIS, A.P. et al. **An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2006, v.152, p.465-512.

DUARTE, G.S.; PEREIRA, A.A.; FARAH, A. **Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods.** *Food Chemistry.* 2010, 118, 851-855.

EMATER-MG – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>>. Acesso em 31 de Maio de 2011.

Expresso Café: Tudo sobre a cultura do Café – Soluções e Informações. Disponível em: <<http://expressocafe.webnode.com.br/>>. Acesso em 10 de Julho de 2011.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. **Phenolic compounds in coffee.** *Brazilian Journal of Plant Physiology.* Março/Junho, 2006, 18, 23-36.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. **Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee.** *Food Chemistry.* 2006, 98, 373-380.

FRANCA, A.S.; MENDONÇA, J.C.F.; OLIVEIRA, L.S. **Composition of green and roasted coffees of different cup qualities**. LWT. 2005, 39, 709-715.

FRANCA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; MENDONÇA, J.C.F.; SILVA, X.A. **Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans**. Food Chemistry. 2005, 90, 89-94.

FERNANDEZ, E.H.; ROMERO, M.G.; PANCORBO, A.C.; GUTIERREZ, A.F. **Application and potential of capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010, 53, 1130–1160.

GALLI, V.; BARBAS, C. **Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee**. Journal of Chromatography A. 2004, 1032, 299–304.

HEČIMOVIĆ, I.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D.; KOMES, D. **Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting**. Food Chemistry doi: 10.1016/j.foodchem. 2011.05.059.

KIM, D.O. et al. **Vitamina C equivalente antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals**. J. Agric. Food Chem. 2002, v. 50, p. 3713-3717.

Lab Spaces. Disponível em:

<http://www.labspaces.net/109170/High_caffeine_consuming_boys_get_greater_rush_from_caffeine_than_girls>. Acesso em 10 de Julho de 2011.

Live Fit Blog: A Fitness Blog With Tips For Getting Fit And Healthy Living.

Disponível em: <<http://livefitblog.com/2010/07/16/chlorogenic-acid-in-coffee-antioxidant/>>. Acesso em 10 de Julho de 2011.

LOTITO, S.B.; FREI, B. **Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?**. Free Radical Biology & Medicine. 2006, 41, 1727-1746.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability**. American Journal Clinical Nutrition. 2004, v.79, p.727-747.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 31 de Maio de 2011.

MARIA, C.A.B.; & MOREIRA, R.F.A. **Métodos para análise de ácido clorogênico**. Química Nova. 2004, Vol. 27, No.4, 586-592.

MARTINS, A.L. **História do Café**. 1.ed., 2ª reimpressão. – São Paulo : Contexto. 2009.

- NAIDU, M.M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S.R.; SRINIVAS, P. **Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee**. Food Chemistry. 2008, 107, 377-385.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays**. Food Research International. 2006, 39, 791-800.
- PINO, F.A.; VEGRO, C.L.R. **Café um guia do apreciador**. 4. ed. ver. e atual. São Paulo: Saraiva. 2008, 200p. ISBN 978-85-02-06785-1.
- PINTO, N.A.V.D.; PEREIRA, R.G.F.A.; FERNANDES, S.M.; THÉ, P.M.P.; CARVALHO, V.D. **Caracterização dos toeres de polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café cru e torrado do sul de Minas Gerais**. R. Bras. Armaz., 2002, Especial Café - Viçosa - MG, n. 4, p.52-58.
- PINTO, N.A.V.D.; FERNANDES, S.M.; PIRES, T.C.; PEREIRA, R.G.F.A.; CARVALHO, V.D. **Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões de bebida do café torrado tipo expresso**. Revista Brasileira de Agrociência. Setembro/Dezembro, 2001, Pelotas, v.7, n.3, p.193-195.
- RODRIGUES, C.I.; MARTA, L.; MAIA, R.; MIRANDA, M.; RIBEIRINHO, M.; MÁGUAS, C. **Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC**. Journal of Food Composition and Analysis. 2007, 20, 440-448.
- SILVA, J.A.F.D.; TAVARES, M.F.M.; CARRILHO W.K.T.C.E. **Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares**. Química Nova. 2007, 30, 740-744.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents**. American Journal of Enology and Viticulture. 1965, 16, 144-158.
- SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova. Julho, 2007, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355.
- TAVARES, M.F.M. **Eletroforese capilar: conceitos básicos**. Química Nova. 1995, 19.
- THOMAZIELLO, R.A.; FAZUOLI, L.C.; PEZZOPANE, J.R.M.; FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C. **Café arábica: cultura e técnicas de produção**. Campinas: Instituto Agrônômico. 2000, 86p.

TRUGO, L.C.; MACRAE, R. **Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees**. Analyst. 1984, 109, 263-266.

WATZIG, H.; DEGENHARDT, M.; KUNKEL, A. **Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications**. Electrophoresis. 1998, n. 19, n. 16-17, p. 2695-2752.